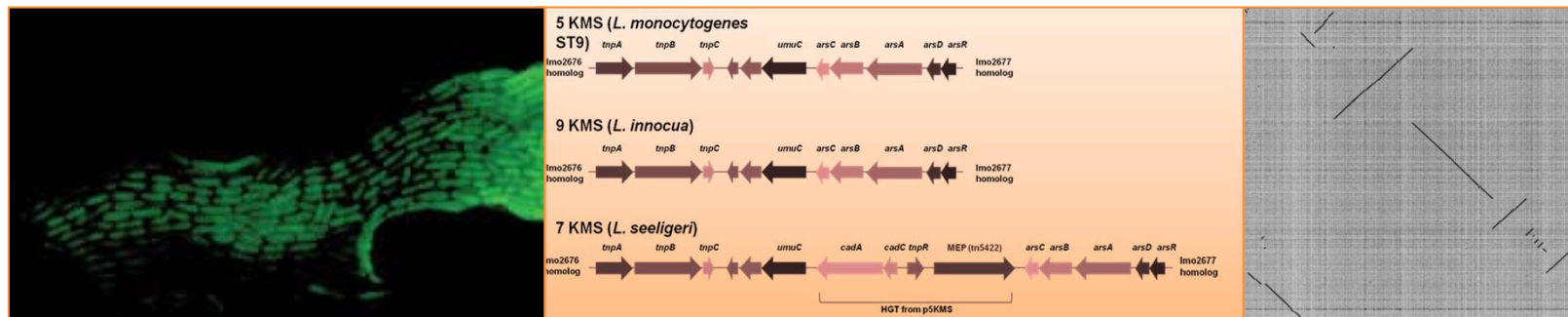


•Lebensmittelgewinnung und –verarbeitung: Problem der Kreuzkontamination (Listerien)



Martin Wagner, Kathrin Rychli, Beatrix Stessl, Stephan Schmitz-Esser

Institut für Milchhygiene, Milchtechnologie und Lebensmittelwissenschaft; Department für Nutztiere und Veterinary Public Health, Veterinärmedizinische Universität, Veterinärplatz 1, 1210 Wien

Martin.Wagner@vetmeduni.ac.at

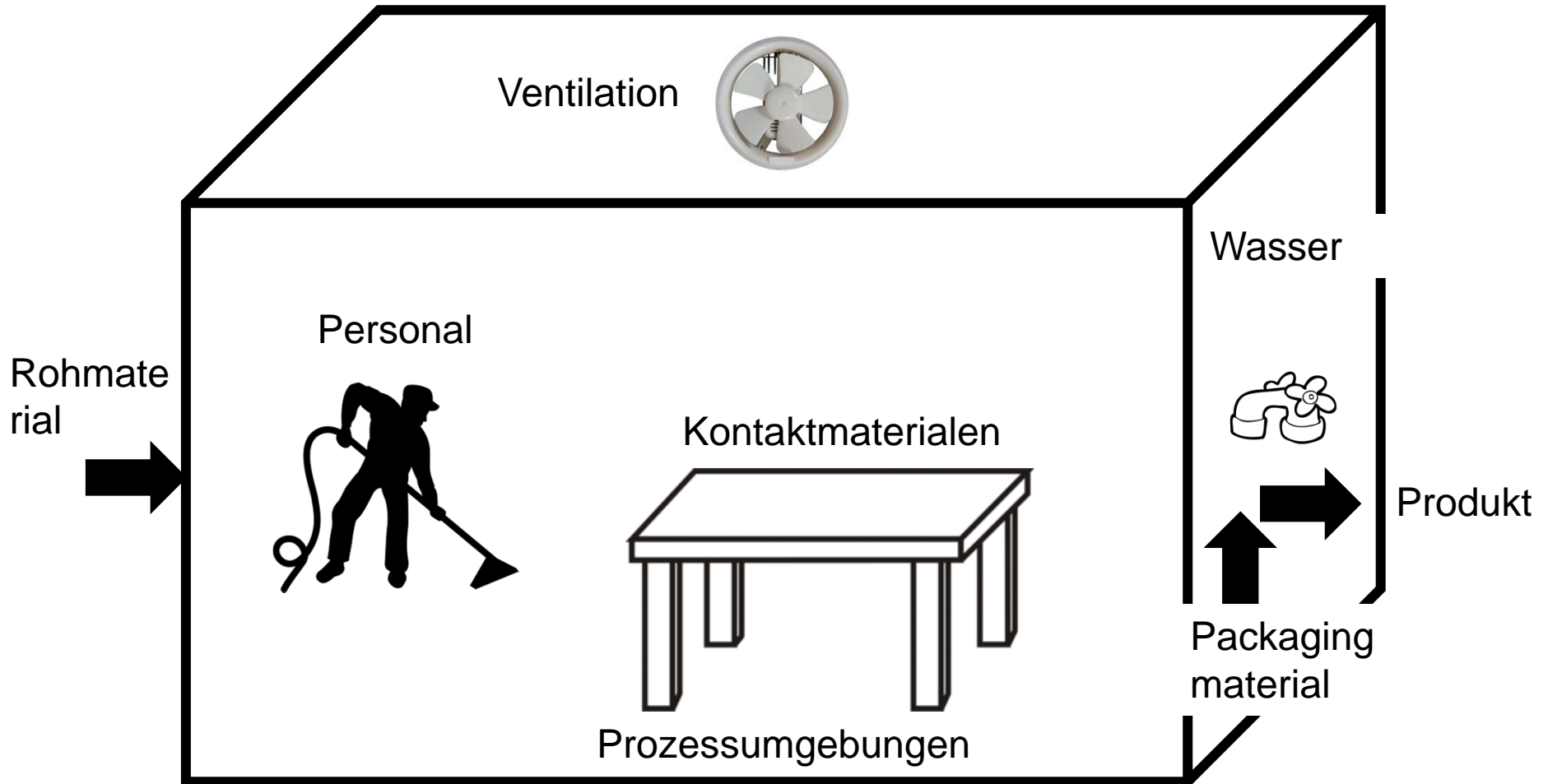
BfR Symposium Risiken entlang von Lebensmittelwarenketten, Berlin, 18.02.2016 – 19.02.2016

PROMISE Protection of Consumers by Mitigation of Segregation of Expertise



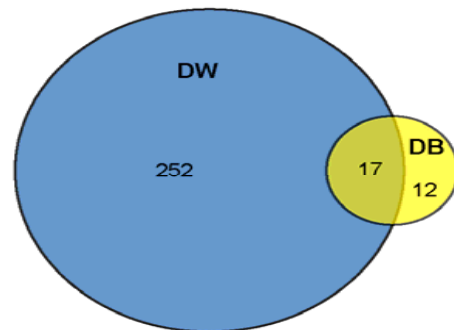
Zu allererst: Danke für die Anregungen und gute Zusammenarbeit

Kontaminationswege sind multipel

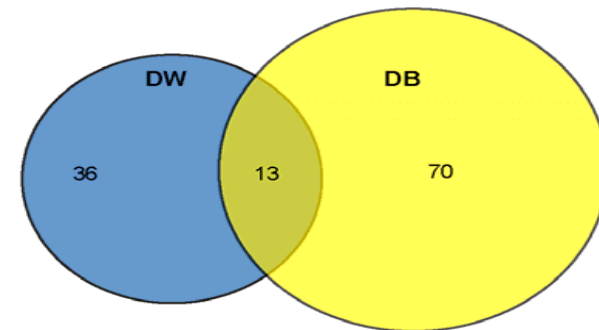


Wie ähnlich sind korrespondierende mikrobielle Ökosysteme (Model Abfluss)?

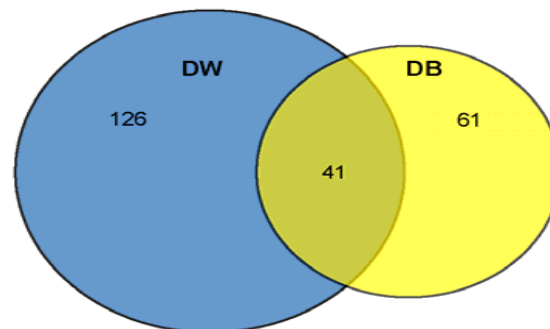
A) Cooling chamber



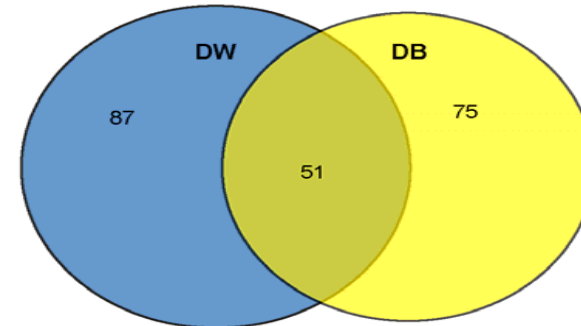
B) Cutting area



C) Washing area



D) Processing area



Wieso das Thema Kreuzkontamination und Listerien?

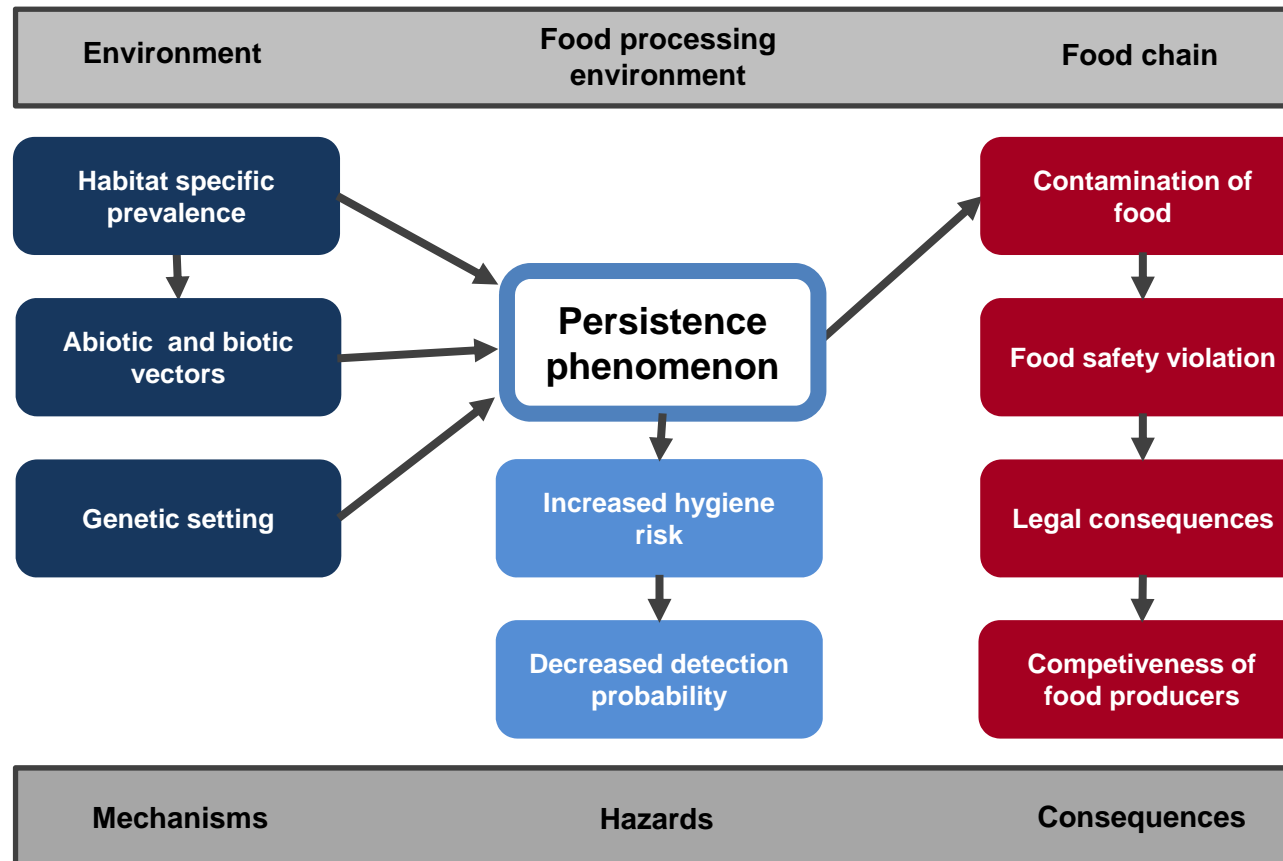
Steigende Listeriose-Inzidenz in vielen EU 28 MS

Ausbrüche an Listeriose vorwiegend in Ländern mit differenzierter Produktionstechnologie und hohem Hygienestandard (in den letzten 5 Jahren: Österreich, Belgien, Dänemark, Schweiz, Deutschland)

Viele Zoonoseerreger haben einen Lifestyle außerhalb der Kette, der wenig erforscht ist (Trennung LMH-Ökologie)

L. monocytogenes zeigt viele Features, die ihn als Pathogen moderner Produktionssysteme vermuten lassen

Mikrobielle Persistenz erleichtert Kreuzkontamination



Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises (Brigitte Carpentier, Olivier Cerf IJFM 145, 2011, 1-8)

- Persistenz: Wie zu definieren?
- Wie schauen Verbreitungsmodelle in Produktionsumfeldern aus?
- Sind persistente Isolate “toleranter” gegen Desinfektionsmitteln?
- Sind persistente Isolate “resistenter” gegen Stressoren (zB. Nährstofflimitation)?
- Persistente Listerien und Biofilmbildung? Können Kommensalen die Biofilmbildung stimulieren?
- Persistente Isolate und Virulenz?

Listerien sind „Klassiker“ für Kreuzkontaminationsphänomene

Country	Status FPE ^a	Sampling events	Occurence (%)	pos ^b /total	sampling			
					(1)	(2)	(3)	(4)
Farmhouse cheese makers								
Slovakia	C ^b	4	1.27	2/157	0/30	1/43	0/43	1/41
Slovakia	UC ^c	4	2.20	4/182	0/45	1/45	0/45	3/47
Ireland	C	4	2.14	4/187	0/43	2/50	1/50	1/44
Ireland	UC	4	6.42	12/187	1/46	2/47	6/47	3/47
Dairies								
Austria	C	4	26.00	123/473	21/81	23/80	13/85	66/227
Austria	UC	4	0.53	1/190	0/50	0/38	1/51	0/51
Spain	UC	4	2.63	4/152	1/36	1/39	1/38	1/39
Greece	C	4	7.22	13/180	11/45	2/46	0/44	0/45
Greece	UC	4	1.74	3/172	0/30	1/44	2/50	0/48
Meat producers								
Spain	C	4	50.45	56/111	14/27	15/28	17/28	10/28
Romania	C	4	26.51	44/166	8/40	12/41	11/42	13/43
Romania	UC	3	18.82	16/85	0/13	2/37	14/35	n. d.

^a FPE food processing environment; ^b pos *L. monocytogenes* positive samples; ^c C contaminated; ^d UC uncontaminated; n. d. not determined;

Nischen des Keimübertrags: *Listeria monocytogenes*

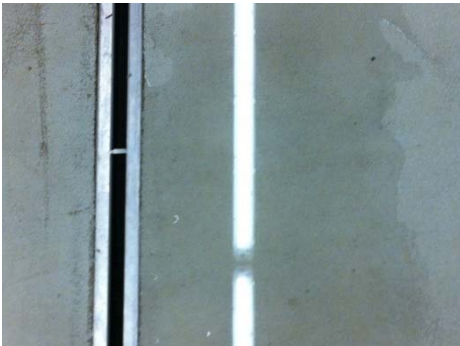
Utensilien



Slicer



Förderbänder



Drains

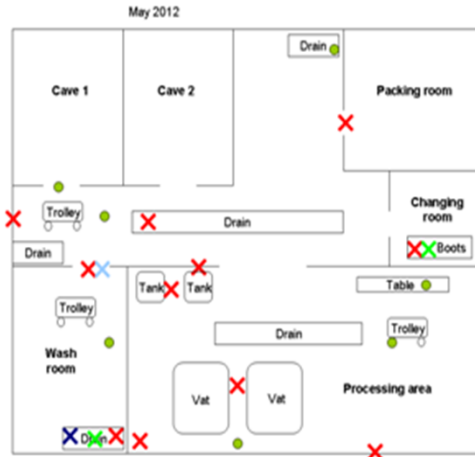


Matten

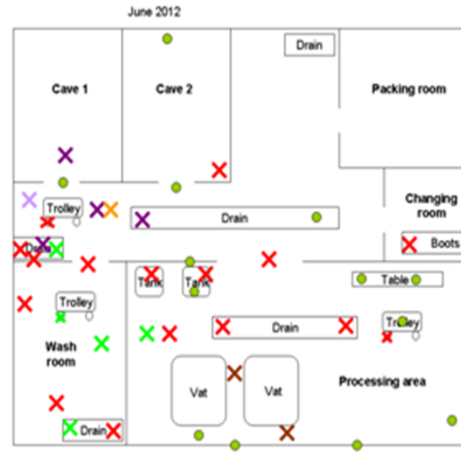


Schläuche

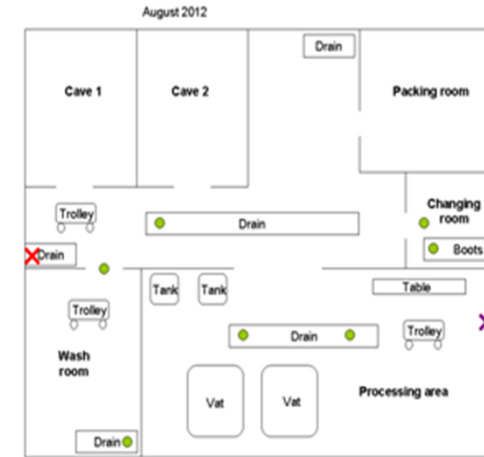
Verbreitungsschemata für Listerien in Prozessumfeldern



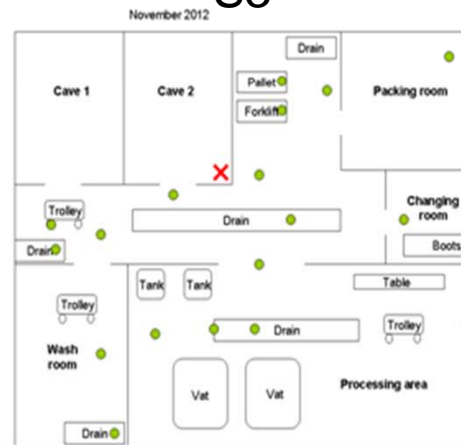
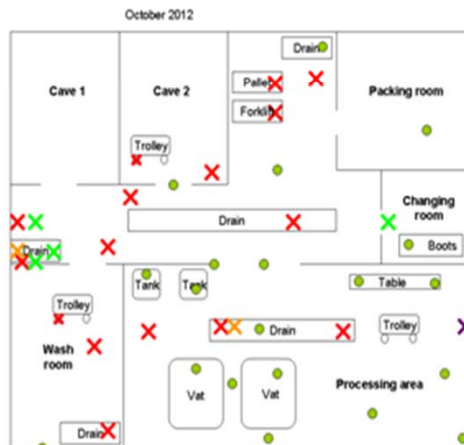
S1: Disseminierte
Kontamination



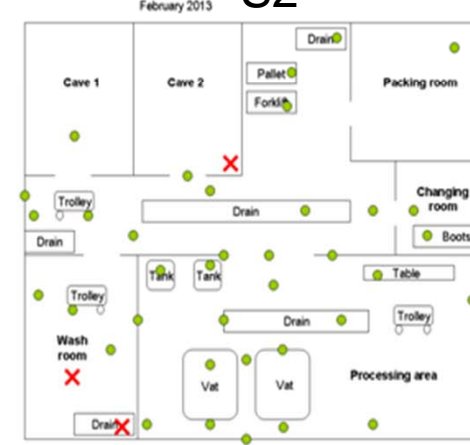
S2: Gerichtete
Kontamination



S3: Hot Spots



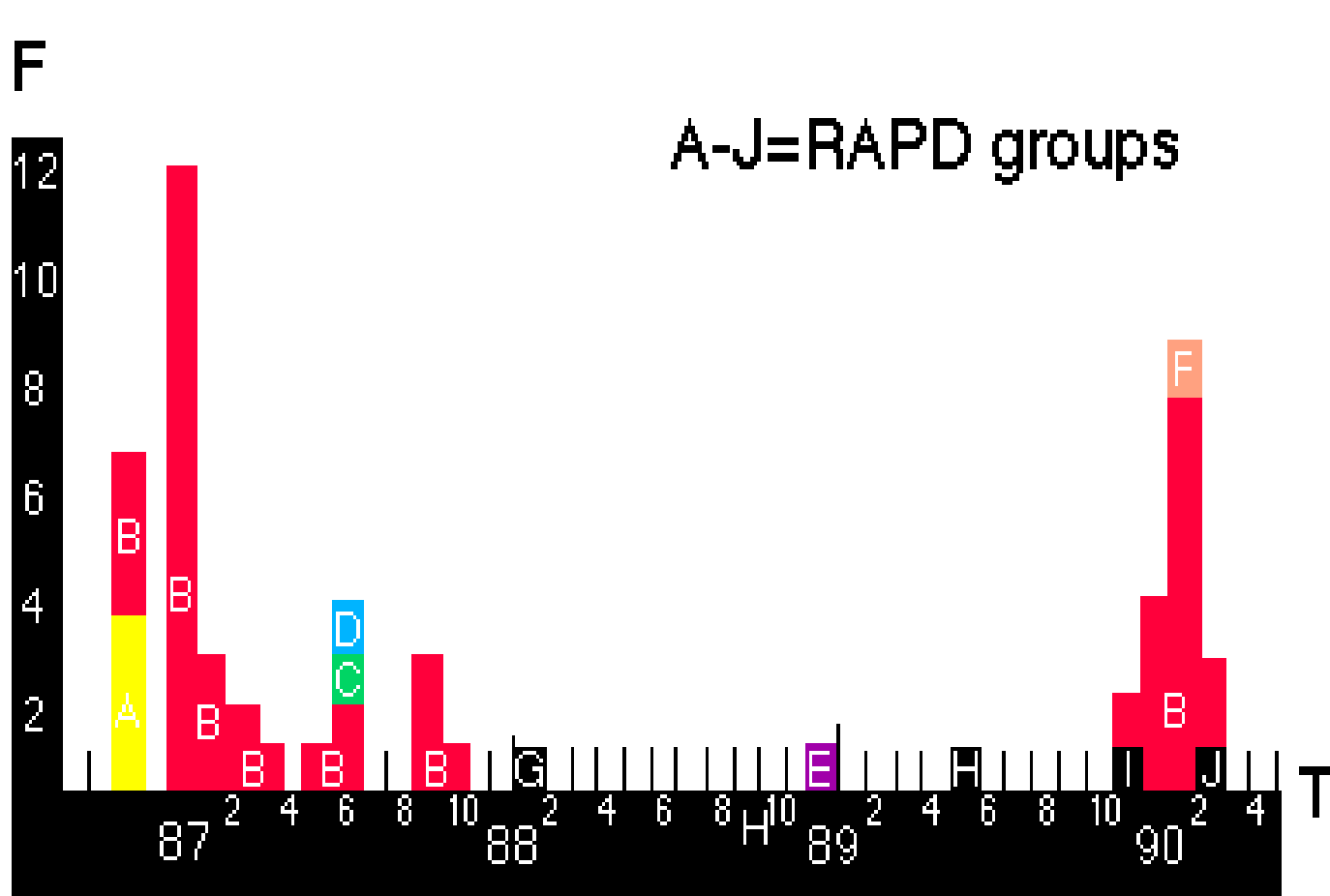
S3



S2

X = Positive ● = negative

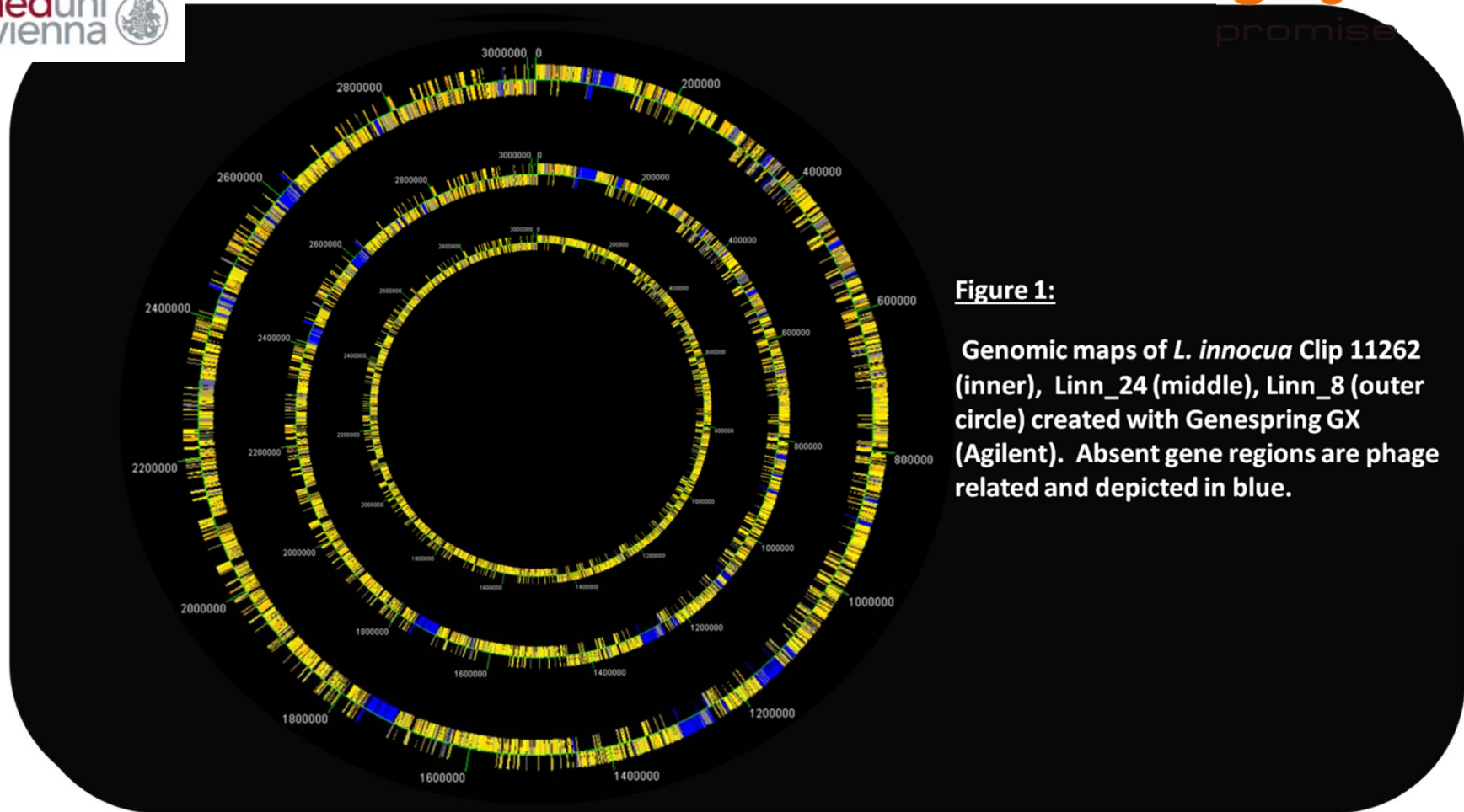
Persistenz von *L. monocytogenes*: wie messen?



Die „Gretchen“ Frage: Ist Persistenz genetisch encodiert?

- Das PAN-GENOME von *L. monocytogenes* ist **hoch stabil**. Interessant sind **hyper variable hotspots** (accessory genome).
- Mobile Elemente (wie ZB *comK* prophage) treiben die nischen-spezifische Adaptation, Persistenz, und Transmission bei *L. monocytogenes*.

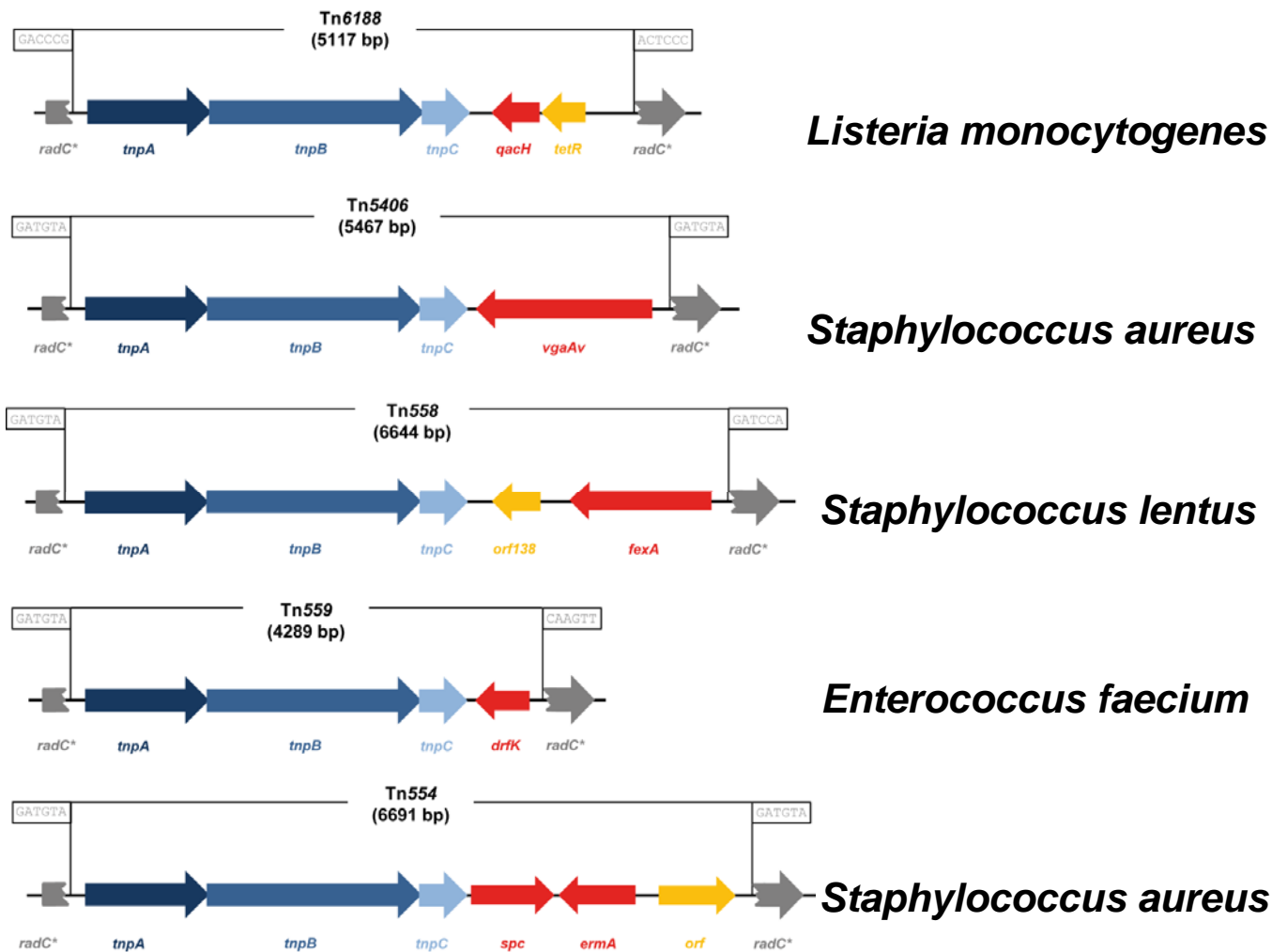
(1) (5) Kuenne et al. (2013) BMC Genetics; (2) Verghese et al. (3) Müller et al. (2014) PlosOne; (4) El-Hanafi et al., (2010), AEM (5) Gilmour et al. (1996) AEM.



Genepool bei persistierenden *L. monocytogenes* and *L. innocua* (n=30) weitgehend homolog.

Microarray data: Genetische Variationen nur in Regionen, wo Phagen inseriert sind

Biomarker für Desinfektionsmitteltoleranz: Tn6188 (und Tn554-ähnliche Transposone)

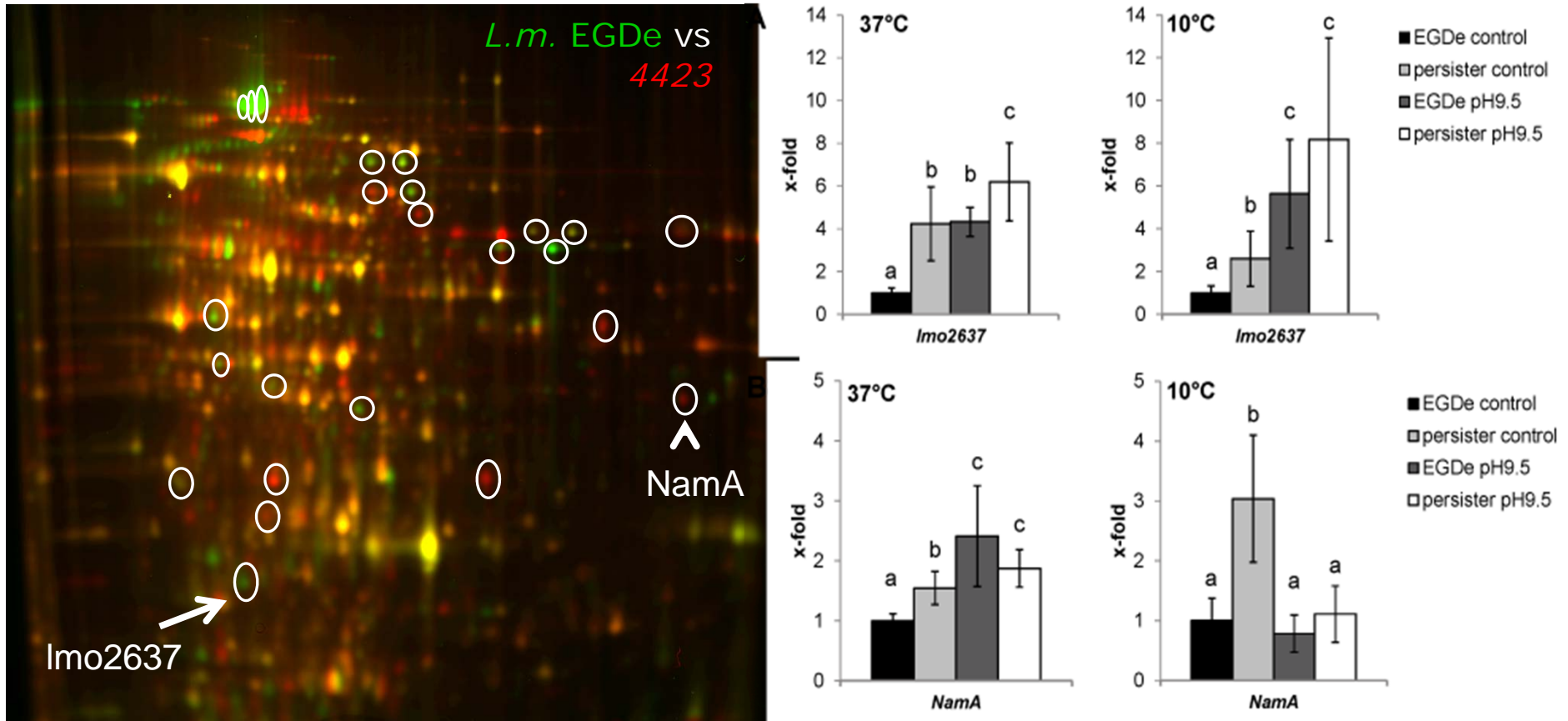


Sind persistente Isolate “resistenter” gegen Stressoren (zB. Nährstofflimitation)?

Drei persistierende Isolate (6179/IRE, 4423/AT, 479a/DK) und Kontrolle: exposition gegen milden Nährstofflimitierung

Stress response (secreted proteins): gemessen durch exoproteomischer Ansatz

Nährstofflimitierung führt zu Resistenz gegen alkalinen Stress



- Persister strains versus EGDe:
8 protein spots upregulated/16 protein spots downregulated

Homology in *Bacillus subtilis* involved in oxidative stress, detoxification process.

- Lmo2637:
■ Membrane anchored lipoprotein

Können Kommensalen die Biofilmbildung von Listerien stimulieren?

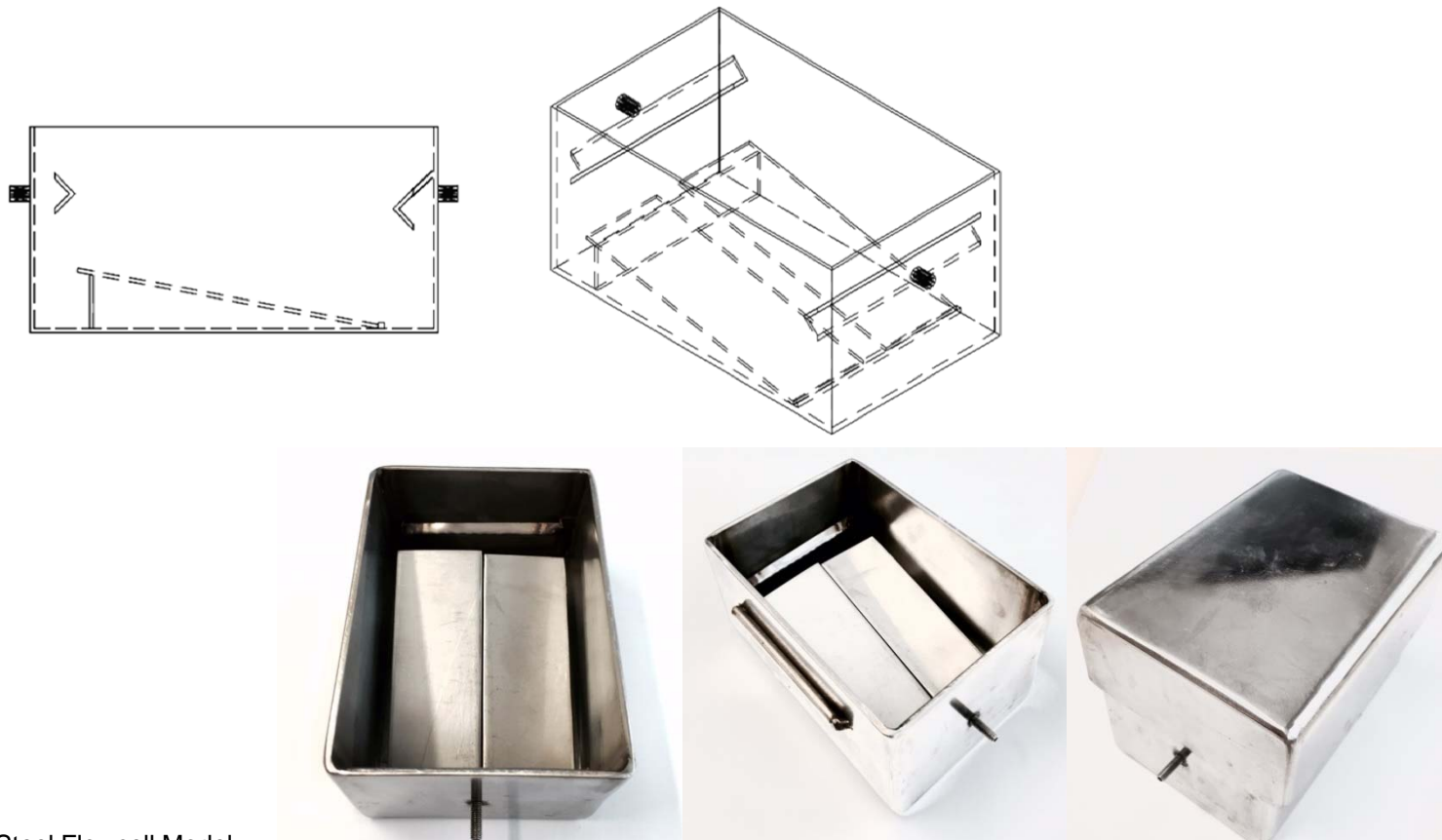
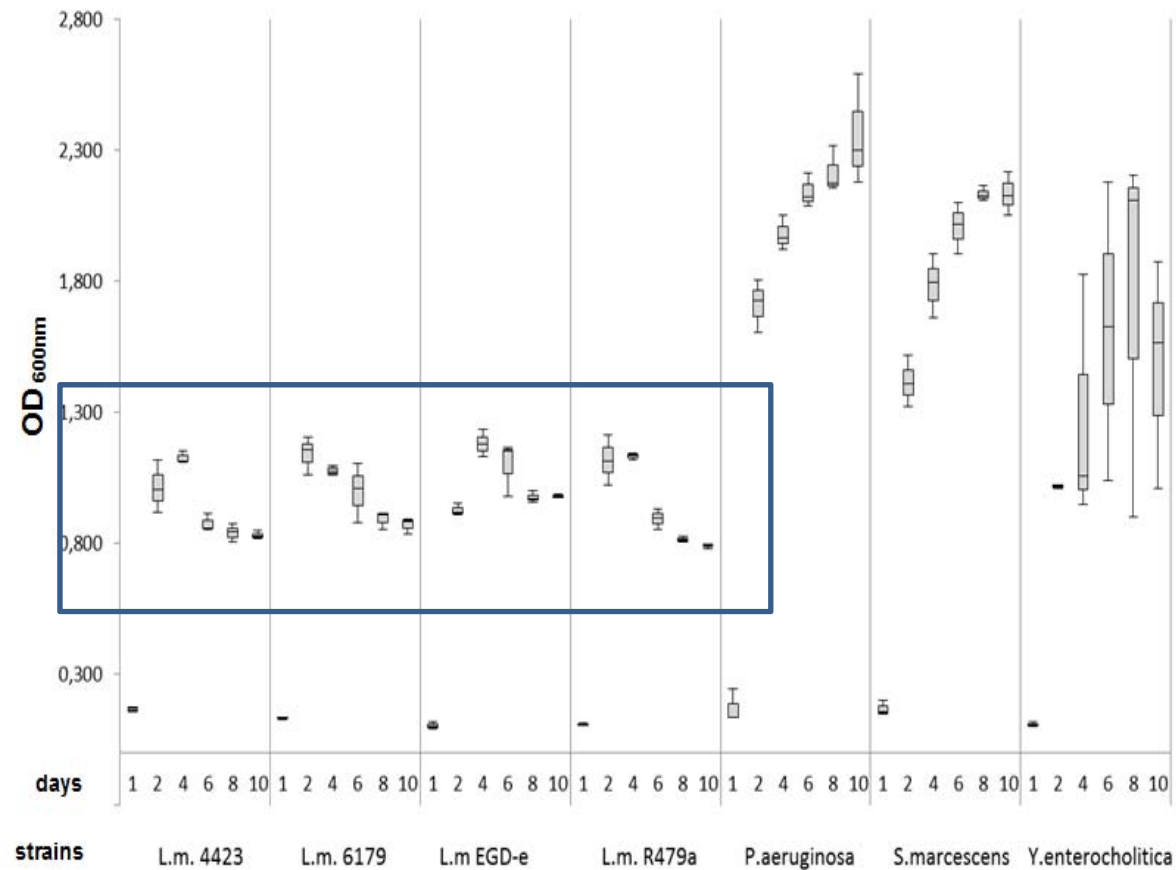


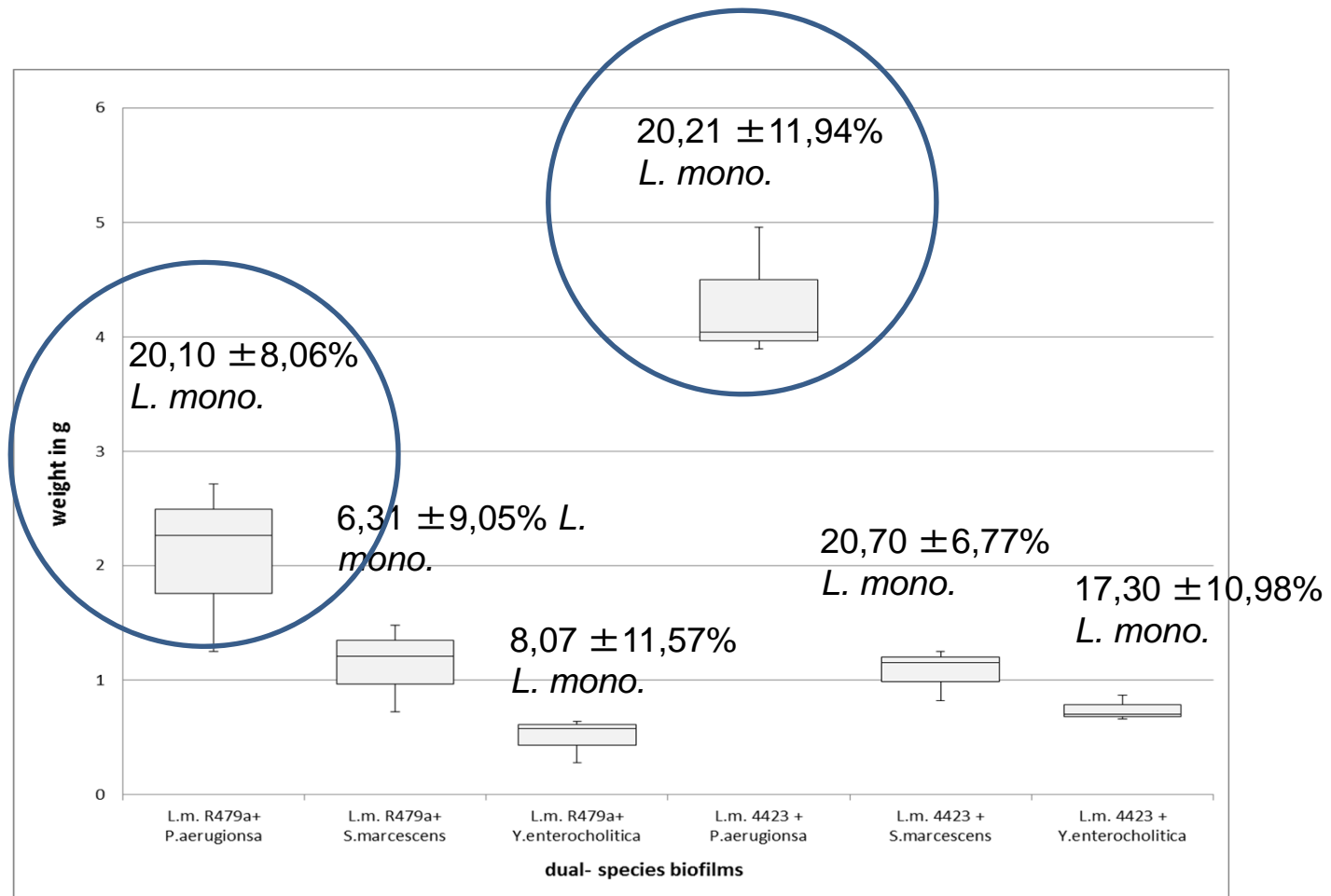
Figure 5: Stainless Steel Flowcell Model

L. monocytogenes sind die schwächsten Biomasseproduzenten im Vergleich zu kälteadaptierte Species

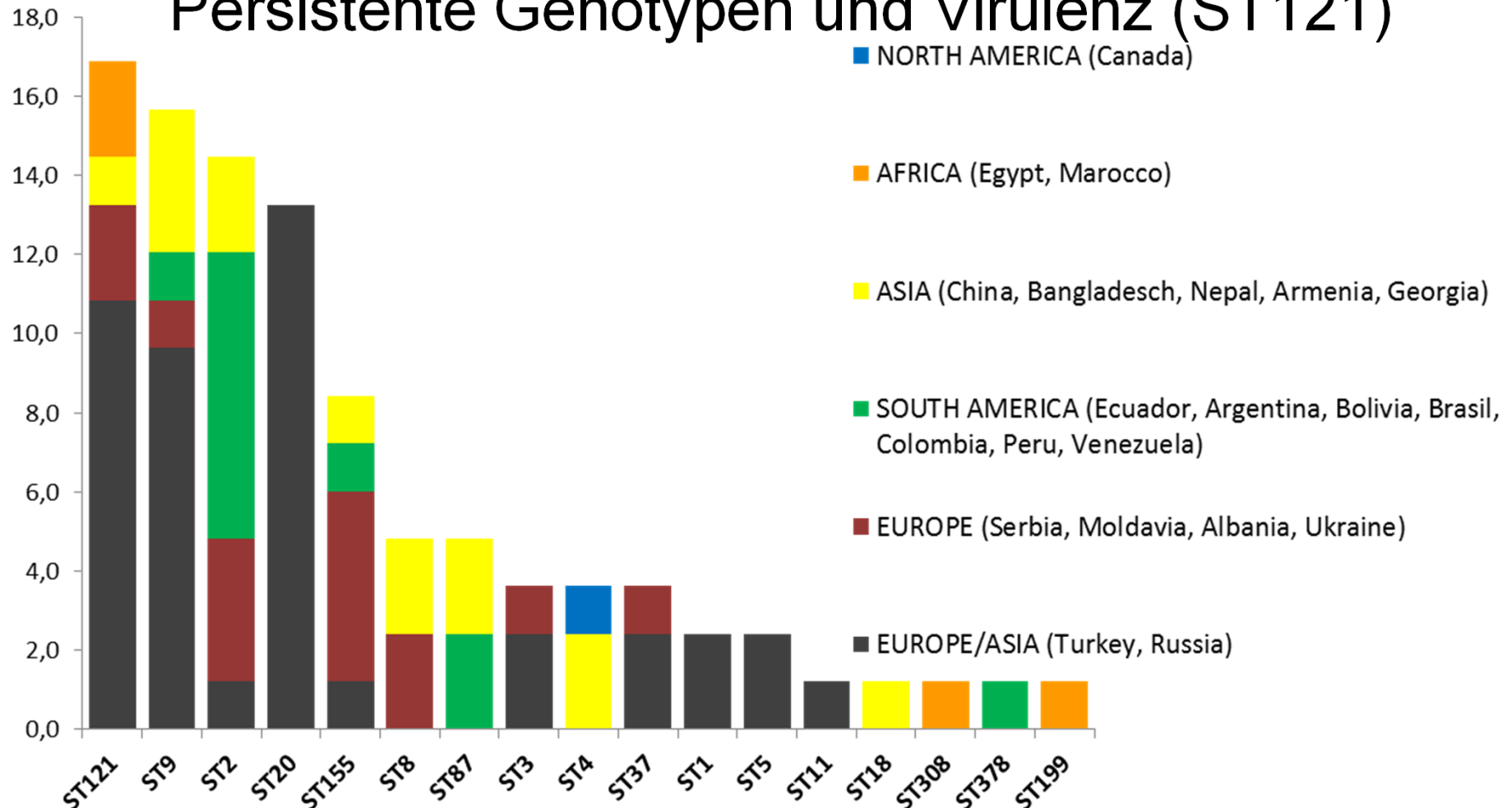


Monokultur

Pseudomonaden fördern die *L. monocytogenes* Biofilmbildung (10° C; Flotation)

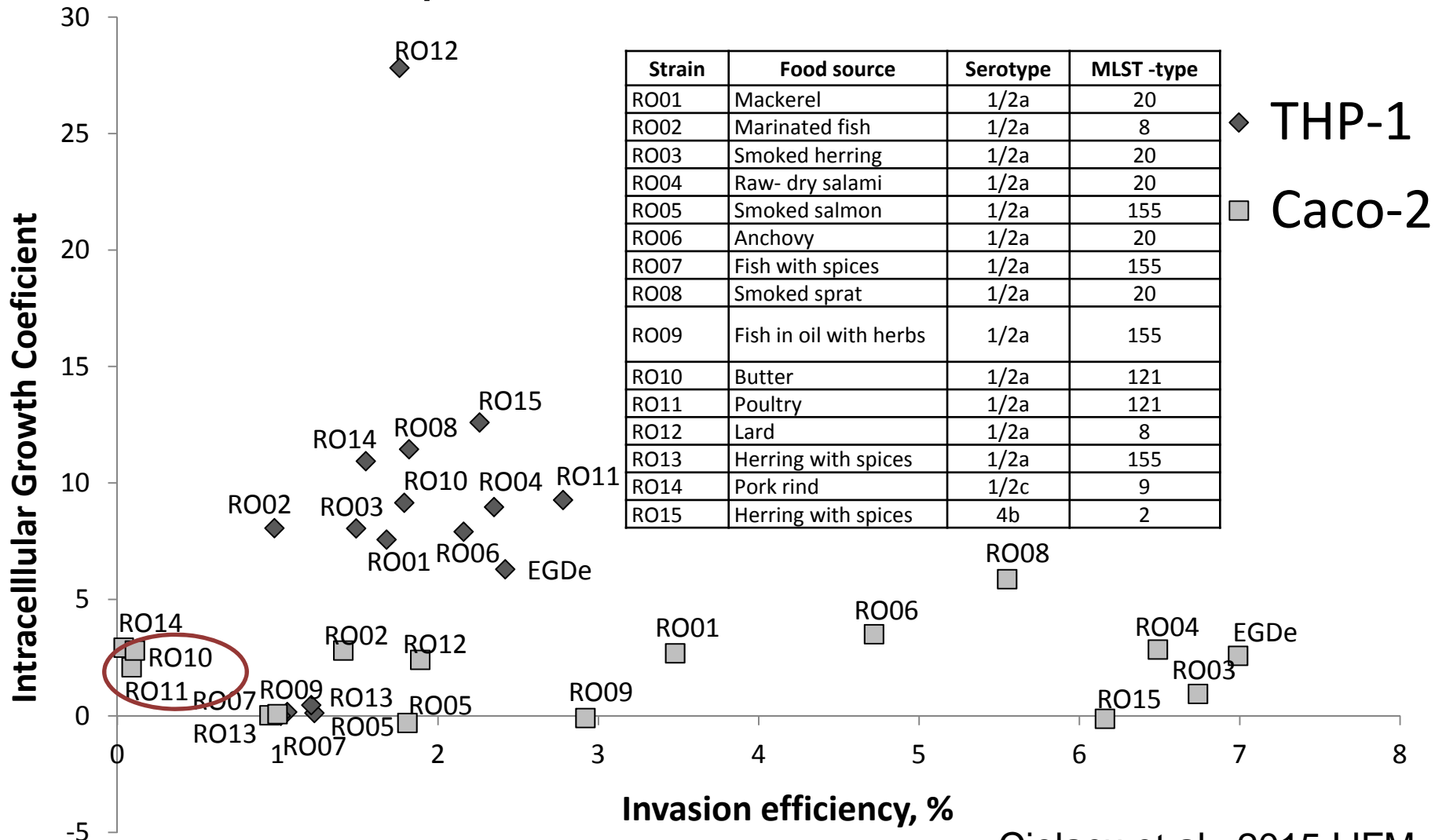


Persistente Genotypen und Virulenz (ST121)

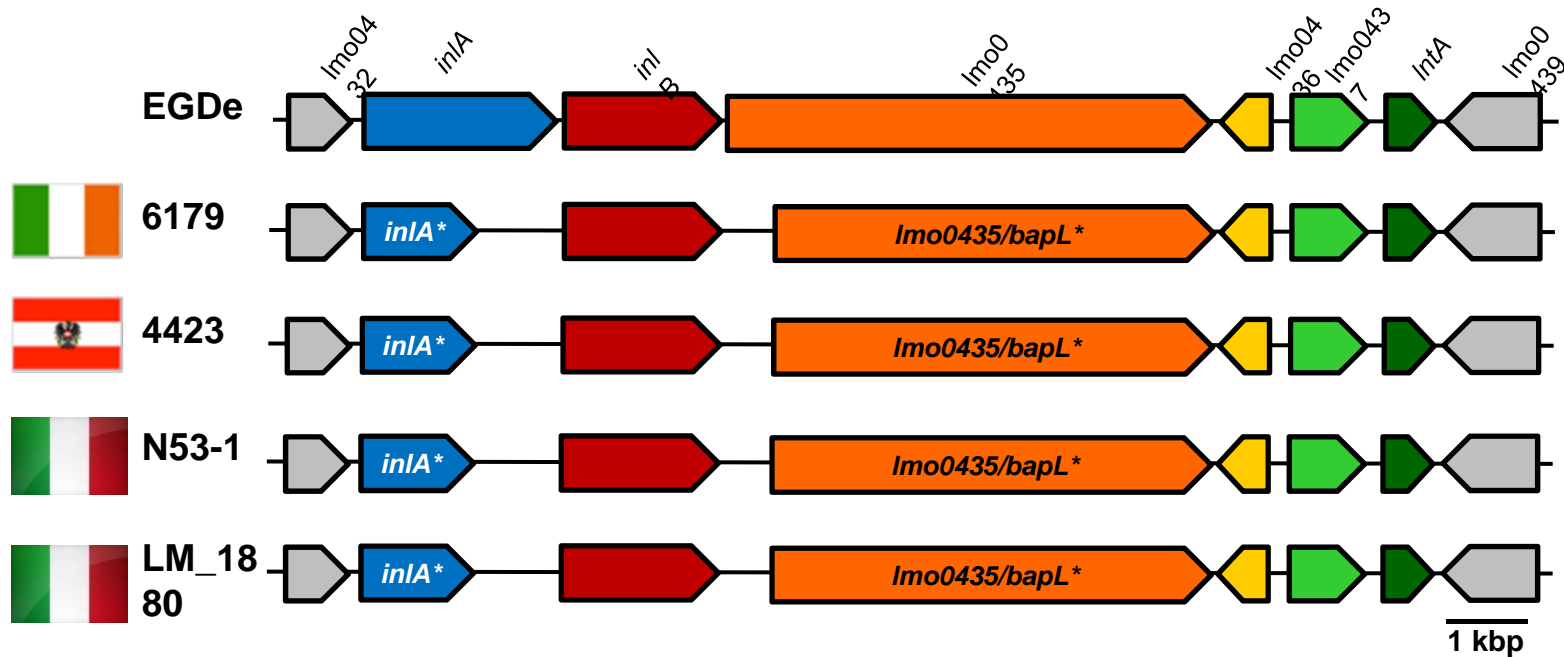


- *L. monocytogenes* MLST 121 Isolate hoch prävalent in Produktionsumfeldern (Ragon et al., 2008 Plos Pathog; Parisi et al. Food Micro, 2010; Hein et al., 2011 Appl Environ Microb.)

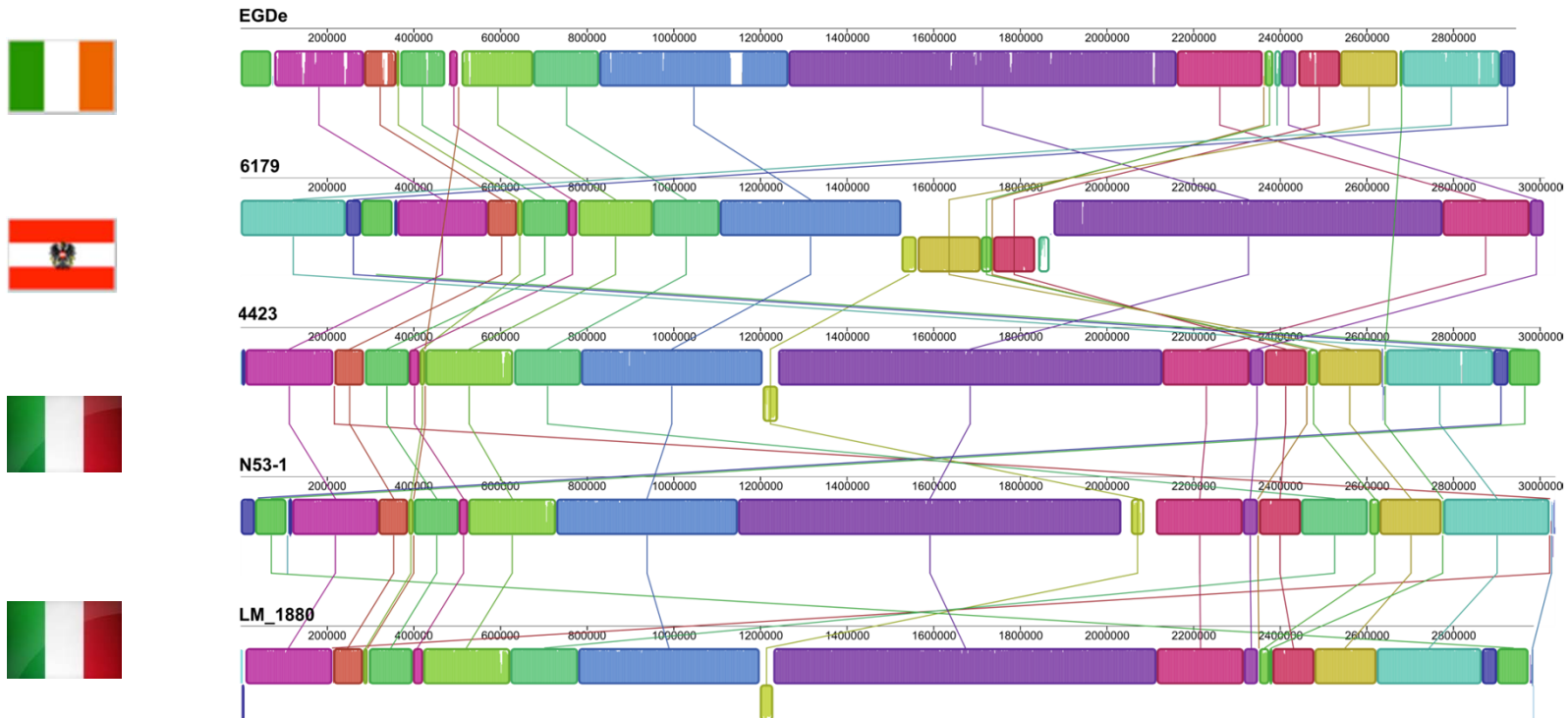
ST121 *L. monocytogenes* sind niedrig virulent in epithelialen Zellkulturen



ST121 haben truncated *inIA* und *bapL* Gene (biofilm formation)



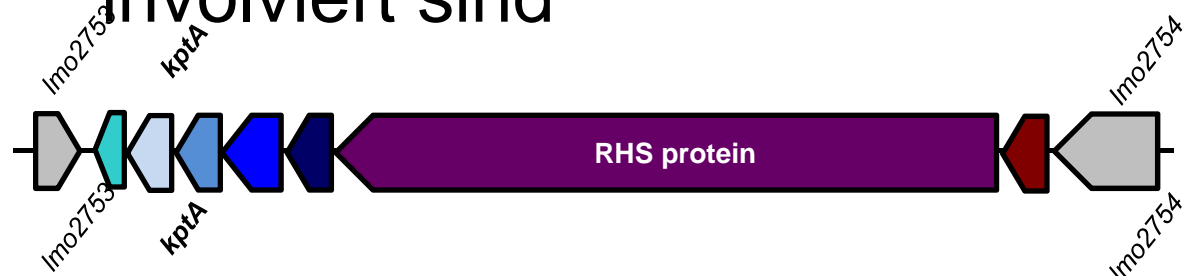
ST 121(multiple origin): Genetischer Hintergrund ist klonal



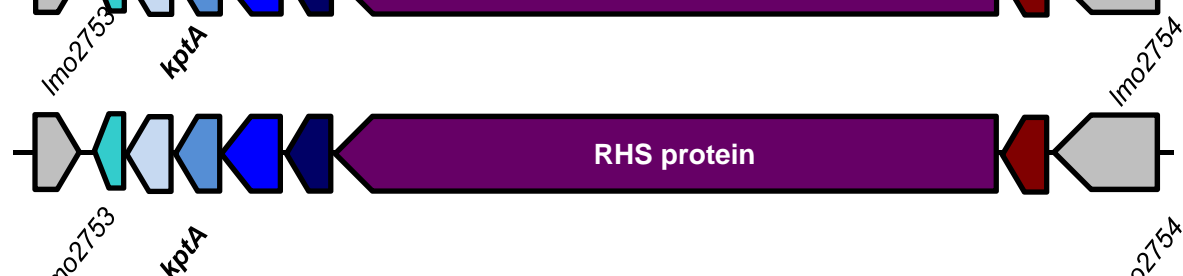
ST121 Genome zeigen Marker, die wahrscheinlich in Kompetitionsmechanismen mit anderen Bakterien involviert sind



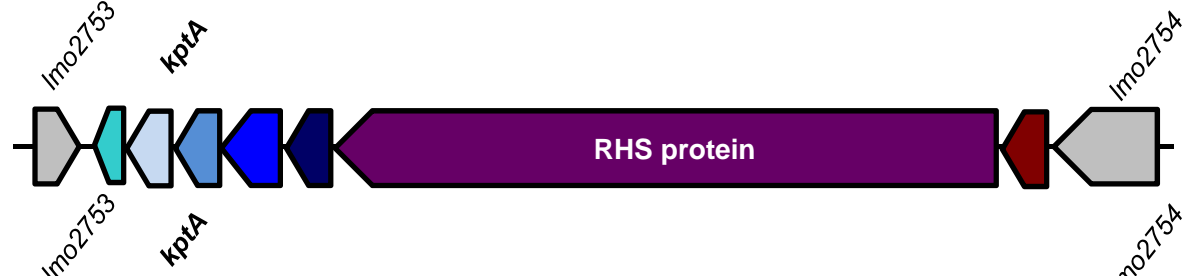
6179



4423



N53-1



LM_1880



kptA codiert für eine RNA 2`
phosphotransferase (*WapA*
schneidet RNA und tRNA)

*3056 bp protein 29 rearrangement
hotspot repeats (Strain competition)*

Take home message: Persistenz ist ein Eckstein in Listeria Kreuzkontaminationsszenarien

